

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 07 367 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 15/87**  
C 12 N 15/63  
C 12 N 5/16  
A 23 L 1/32  
A 01 K 67/00

②1 Aktenzeichen: 196 07 367.7  
②2 Anmeldetag: 27. 2. 96  
④3 Offenlegungstag: 28. 8. 97

⑦1 Anmelder:  
Progen Biotechnik GmbH, 69120 Heidelberg, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:  
Schneider, Wolfgang Johann, Prof., Mödling, AT;  
Nimpf, Johannes, Alland, AT

- ⑤4 Herstellung von transgenem Geflügel durch Gentransfer mit p95-spezifischen Genfähren
- ⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteinkonjugate und DNA-Protein-Komplexe, die als Gentransfersysteme geeignet sind, sowie ein Verfahren zur Herstellung von transgenem Geflügel.

DE 196 07 367 A 1

DE 196 07 367 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 97 702 035/485

12/26

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteinkonjugate und DNA-Protein-Komplexe, die als Gentransfersysteme geeignet sind, sowie ein Verfahren zur Herstellung von transgenem Geflügel

Die Entwicklung von Techniken zur Erzeugung transgener Tiere, die fremde und/oder manipulierte Gene in ihrer Keimbahn tragen, ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch für kommerzielle Zwecke von größter Bedeutung. Zahlreiche Experimente zur Untersuchung der Expression und Funktion von Genen, zur Wirksamkeit genetischer Kontrollelemente und zur Erzeugung von Tiermodellen für menschliche Krankheiten wurden bisher an transgenen Tieren, insbesondere an der Maus, durchgeführt. Durch selektive Deletion bestimmter Gene und die Bestimmung des resultierenden Phänotyps der Maus konnten wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion von Genen gewonnen werden, die mit üblichen biochemischen oder molekularbiologischen Techniken nicht erreichbar gewesen wären.

Zur Erzeugung transgener Säugetiere gibt es mehrere Methoden, die heute in breitem Umfang angewandt werden:

- i) Mikroinjektion von DNA in den Pronucleus der Eizelle,
- ii) Transfektion embryonischer Stammzellen und deren Wiedereinführung in Blastulae und
- iii) Infektion des Embryos durch retrovirale Vektoren, welche ein interessierendes Gen enthalten.

Die Manipulation der Keimbahn von Vögeln, insbesondere von Hühnern, wäre sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Geflügelindustrie von höchster Bedeutung. Auf diese Weise könnte Geflügel erzeugt werden, das gegenüber Krankheiten resistent ist oder eine verbesserte Nahrungsverwertung und Wachstumsrate aufweist. Weiterhin könnten transgene Vögel als Bioreaktoren verwendet werden, um Biomoleküle und Polypeptide wie etwa Immunglobuline, Wachstumsfaktoren oder Enzyme zu erzeugen, die dann auf einfache Weise aus den Eiern aufgereinigt werden können. Eine andere wichtige Anwendungsmöglichkeit für transgenes Geflügel in der Lebensmittelindustrie ist die Erzeugung von Eiern mit geringem Cholesteringehalt.

Trotz dieser großen potentiellen Anwendungsmöglichkeiten konnten bisher nur geringe Erfolge bei der Herstellung von transgenem Geflügel erreicht werden. Der Gentransfer wurde nämlich bisher sehr stark durch Probleme behindert, die mit der in vitro-Manipulation und Kultivierung des frühen Hühnerembryos in Zusammenhang stehen und auf das Reproduktions- und Embryonalentwicklungssystem bei Vögeln zurückzuführen sind. Das Dotter enthaltende Ei wird nämlich direkt nach der Ovulation befruchtet und die Embryonalentwicklung beginnt im Eileiter während der Ausbildung des Eis. Der Vogelembryo wäre direkt nach der Oviposition leicht zugänglich, doch zu diesem Zeitpunkt besteht das Blastoderm aus etwa 60.000 Zellen, die in zwei Schichten organisiert sind (Stern (1990), Development 109, 667—682; Kochav et al. (1980), Dev.Biol. 79, 296—308). Dies hat zur Folge, daß die DNA-Mikroinjektion in männliche Pronuklei in befruchteten Eiern im Einzellenstadium nur mit größten Schwierigkeiten möglich ist. Dennoch wurde diese Prozedur vor kurzem erfolgreich zur Erzeugung transgener Vögel durch Keimbahntransmission der fremden DNA angewendet (Love et al. (1994), Bio Technology 12, 60—63). Für dieses Verfahren muß jedoch ein kompliziertes ex vivo-System in Wirtsschalen für die gesamte Dauer der embryonischen Entwicklung vor dem Schlüpfen angewendet werden (Ono et al. (1994), Dev.Biol. 161, 126—130; Perry (1988), Nature 331, 70—72), wodurch es für eine Anwendung in großem Umfang relativ ungeeignet ist. Weiterhin muß dieses Verfahren auch noch erst in anderen Labors erfolgreich reproduziert werden.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß pluripotente Zellen, die aus einem Blastoderm der Stufe X, das aus gelegten Eiern isoliert wird, vereinzelt wurden, zu in der Keimbahn chimären Hühnern führten, wenn sie in durch Gammastrahlung geschwächte Empfängerembryos injiziert wurden (Carsience et al. (1993), Development 117, 669—675). Dieses Verfahren wurde als geeignete Methode zur Manipulation des Hühnergenoms vorgeschlagen (Etches et al. (1993), Poultry Sci. 72, 882—889). Jedoch wird erst die zukünftige Entwicklung zeigen, ob das Verfahren tatsächlich zur Erzeugung transgener Vögel geeignet ist.

Zur Zeit besteht die einzige praktisch durchführbare Möglichkeit zur Erzeugung transgener Vögel darin, das Vogelblastoderm mittels Injektion rekombinanter Retroviren durch die Eierschale zu infizieren (Salter et al. (1986), Virology 157, 236—240; Bosselman et al. (1989), Science 243, 533—535). Mit dieser Technik werden jedoch retrovirale Sequenzen in das Vogelgenom eingeführt, was aus mehreren Gründen von Nachteil ist. Erstens können retrovirale Sequenzen das Expressionsmuster des transgenen Organismus stark beeinflussen, wodurch die Erzeugung transgener Tiere mit kontrollierter Expression des Fremdgens erschwert wird. Zweitens beinhaltet die Einführung retroviraler Sequenzen das Risiko der Erzeugung rekombinanter Organismen mit Wildtyp-Viren. Drittens dürfte die Verwendung von Retroviren in der kommerziellen Geflügelhaltung von der Öffentlichkeit nur sehr schlecht akzeptiert werden, da gerade sehr große Anstrengungen zur Eliminierung solcher Viren aus kommerziell gehaltenem Geflügel unternommen werden (Perry und Sang (1993), Transgenic Res. 2, 125—133).

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein Gentransfersystem zur Erzeugung transgener Tiere, insbesondere transgener Vögel, bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise vermieden werden. Insbesondere soll das Gentransfersystem die Erzeugung von transgenem Geflügel auf einfache Weise mit hoher Effizienz ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung eines Gentransfersystems, das auf dem Transfer von Nucleinsäuren in eine Zielzelle mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose beruht. Dieses System eignet sich generell zum Transfer von Nucleinsäuren in Zellen und insbesondere zum Transfer von DNA in die Eizellen von Hühnern und anderen eierlegenden Spezies, um transgene Tiere herzustellen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, umfassend

- a) einen Liganden für einen Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie und  
b) einen Nucleinsäure-Carrier.

Das erfindungsgemäße Konjugat eignet sich hervorragend als Genfahre zur Einschleusung von fremden Nucleinsäuren in eine Zelle. Die Ligandenkomponente des Konjugats bindet dabei an einen Rezeptor auf der Zielzelle, wodurch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose des Konjugats sowie einer damit assoziierten Nucleinsäure in die Zielzelle bewirkt werden kann. Die Nucleinsäure-Carrier-Komponente des Konjugats bildet mit einer Nucleinsäure, insbesondere einem DNA-Molekül, welches in die Zielzelle eingeführt werden soll, einen unter physiologischen Bedingungen im wesentlichen stabilen Komplex. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Konjugats gelingt insbesondere die Einschleusung fremder Nucleinsäuren in Eizellen von Vögeln und insbesondere Hühnern, wodurch die Herstellung von keimbahntransformierten transgenen Vögeln auf einfache Weise möglich wird.

Die Ligandenkomponente des Konjugats wird vorzugsweise so ausgewählt, daß sie an den Hühnereizellenrezeptor p95 bzw. an ein Analogon dieses Rezeptors in anderen Vogelspezies bindefähig ist. Besonders bevorzugt wird ein möglichst selektiv an p95 bzw. ein Analogon davon bindefähiger Ligand verwendet. p95 ist an der Oberfläche wachsender Hühnereizellen lokalisiert und vermittelt die Aufnahme von VLDL und Vitellogenin (VTG) aus dem Blutstrom, die mehr als zwei Drittel der Trockenmasse der vollständig entwickelten Eizelle bilden. Die Klonierung und rekombinante Expression des Hühnereizellenrezeptors p95 ist in der internationalen Patentanmeldung WO95/15379 beschrieben, auf deren Offenbarung hier ausdrücklich Bezug genommen wird.

Als Rezeptor-Liganden geeignet sind daher insbesondere Lipoproteine, Eigelbvorläuferproteine, heterologe Rezeptor-bindefähige Proteine oder Fragmente solcher Proteine, welche die Fähigkeit zur Rezeptorbindung, insbesondere an p95, aufweisen. Vorzugsweise ist die Ligandenkomponente des erfindungsgemäßen Konjugats ein Lipoprotein, Protein oder Peptid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend VLDL, Apolipoprotein B, Apolipoprotein E, Lipoproteinlipase,  $\alpha_2$ -Macroglobulin, Pregnancy Zone Protein, Vitellogenin, Plasminaktivator-Plasminaktivatorinhibitor 1-Komplex, Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A, 39 kD Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP), Riboflavin-bindendes Protein, Rous-Sarcomavirus-Hüllprotein, Lactoferrin Vesikular-Stomatitisvirus-Oberflächenepitop oder Rezeptorbindende Fragmente der zuvor genannten Substanzen.

Besonders bevorzugt als Liganden sind einerseits die Eigelb-Vorläuferproteine VLDL, Vitellogenin und Riboflavin-bindendes Protein, die auf bekannte Weise aus mit Östrogen behandelten Hähnen gewonnen werden können (George et al. (1987), J.Biol. Chem. 262, 16838—16847; MacLachlan et al. (1994), J.Biol.Chem. 269, 24127—24132; Stifani et al. (1988), Biochem.J. 250, 467—475). Andererseits können auch kleine Proteine mit hoher Affinität für p95 verwendet werden, insbesondere das Rezeptorassoziierte Protein RAP (Hiesberger et al. (1995), J.Biol. Chem. 270, 18219—18226), Lactoferrin (Hiesberger et al. (1995), Supra) und Apolipoprotein-E (Steyrer et al. (1990), J.Biol.Chem. 265, 19575—19581). Diese Proteine können auf einfache Weise aus natürlichen Quellen, z. B. Kuhmilch für Lactoferrin, Kaninchen- $\beta$ -VLDL für Apo E, oder als rekombinante Proteine in Bakterien gewonnen werden. Weiterhin können auch kleine Peptide verwendet werden, welche die Binderegionen der oben genannten Proteine enthalten (Mahley (1988), Science 240, 622—630; Warshawsky et al. (1994), J.Biol.Chem. 269, 3325—3330; Hüttinger et al. (1988), Clin.Biochem. 21, 87—92).

Alternativ kann das erfindungsgemäße Konjugat als Ligandenkomponente auch einen mit dem Rezeptor bindefähigen Antikörper bzw. ein Fragment eines solchen Antikörpers enthalten. Besonders bevorzugt sind einzelkettige Antikörperfragmente, welche an die Ligandenbindedomäne von p95 mit hoher Affinität binden. Ein derartiges Antikörperfragment, welches alle bekannten physiologischen Liganden vom Rezeptor verdrängt und auf einfache Weise in großen Mengen durch rekombinante DNA-Technologie, z. B. aus dem Überstand von Phagen-infizierten Bakterien hergestellt werden kann, ist bei Hodits et al. (1995), J.Biol. Chem. 270, 24078—24085 beschrieben.

Die Nucleinsäure-Carrier-Komponente des erfindungsgemäßen Konjugats ist eine Substanz, welche in der Lage ist, mit einer Nucleinsäure einen unter physiologischen Bedingungen im wesentlichen stabilen Komplex zu bilden, der durch Rezeptorvermittelte Endozytose in eine Zielzelle eingeschleust werden kann. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Nucleinsäure-Carrier ein Nucleinsäure-komplexierendes Polykation, insbesondere ein Polypeptid, welches eine Vielzahl von positiven Ladungen trägt. Besonders bevorzugt ist der Nucleinsäure-Carrier in dieser Ausführungsform der Erfindung ein Poly-L-Lysin.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann auch ein viraler Nucleinsäure-Carrier verwendet werden. Ein solcher viraler Nucleinsäure-Carrier umfaßt vorzugsweise ein leeres Viruspartikel, welches zur Aufnahme von Nucleinsäuren in der Lage ist. Besonders bevorzugt umfaßt der Nucleinsäure-Carrier ein leeres Viruspartikel von Adeno-assoziiertem Virus (AAV).

Das erfindungsgemäße Konjugat zwischen Rezeptorligand und Nucleinsäure-Carrier kann einerseits durch chemische Kopplung beider Komponenten hergestellt werden. Diese chemische Kopplung kann nach an sich bekannten Methoden, z. B. nach der Carbodiimidmethode unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid als Kopplungsreagenz erfolgen. Andererseits kann der Ligand mit dem Nucleinsäure-Carrier auch eine genetische Fusion bilden. Derartige genetische Fusionen zwischen dem Rezeptorliganden und dem Nucleinsäure-Carrier können beispielsweise durch rekombinante DNA-Methoden, z. B. durch Verknüpfung einer für RAP, Lactoferrin, Apolipoprotein E oder ein Rezeptor-bindefähiges Antikörperfragment kodierenden DNA-Sequenz mit einer für Polylysin oder einem viralen Capsidprotein kodierenden DNA-Sequenz und Expression des resultierenden Konstrukts in einer geeigneten Wirtszelle ohne weiteres hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex eines erfindungsgemäßen Konjugats aus Rezeptor-Ligand und Nucleinsäure-Carrier mit einer Nucleinsäure. Vorzugsweise ist dieser Komplex unter physiologischen Bedingungen im wesentlichen stabil. Die Nucleinsäure dieses Komplexes ist vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, die in linearer oder zirkulärer Form vorliegen kann. Die Herstellung des Komplexes kann

durch Inkubation des Konjugats mit einer Nucleinsäure unter solchen Bedingungen erfolgen, bei denen eine Komplexbildung zwischen der Nucleinsäure-Carrier-Komponente des Konjugats und der Nucleinsäure stattfindet. Unter "Komplexbildung" im Sinne der vorliegenden Erfindung kann entweder eine direkte, z. B. ionische Wechselwirkung zwischen Carrier und Nucleinsäure wie im Falle eines Polylysin-Carriers oder eine Verkapselung wie im Falle eines viralen Carriers zu verstehen sein.

Das Mengenverhältnis zwischen Konjugat und Nucleinsäure kann in weiten Bereichen variiert werden. Der Fachmann kann das optimale Verhältnis für eine bestimmte Nucleinsäure durch einfache in vitro Versuche ermitteln. Die Nucleinsäure ist vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, die in linearer oder/und zirkulärer Form vorliegen kann.

Das erfindungsgemäße Konjugat oder der erfindungsgemäße Konjugat-Nucleinsäure-Komplex kann als Genfähre zur Einschleusung von Nucleinsäuren in eine Zelle verwendet werden, an deren Oberfläche zweckmäßigerweise ein Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie, vorzugsweise der p95-Rezeptor lokalisiert ist. Auf diese Weise kann einerseits ein Gentransfer in in vitro kultivierte Zellen, z. B. in mit p95 transfizierten COS-Zellen (Bujo et al. (1994), EMBO J. 13, 5165—5175) durchgeführt werden. Auf diese Weise kann bei Verwendung von nachweisbaren Reportergenen wie etwa dem Beta-Galactosidasgen oder dem Luciferasgen und bei Verwendung unterschiedlicher Mengenverhältnisse von Konjugat und Nucleinsäure eine Optimierung der Gentransfereffizienz erreicht werden.

Andererseits eignet sich das Verfahren auch natürlich zur Herstellung transgener Tiere, z. B. transgener Vögel und insbesondere transgener Hühner. Hierzu können die Konjugat-Nucleinsäure-Komplexe in den Blutkreislauf von Legehennen injiziert werden, von wo sie dann über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die wachsende Eizelle gelangen. In frühen Stadien der Embryonalentwicklung internalisieren die Zellen der Blastenschicht Eigelb direkt in ihr Zytoplasma. Noch dazu ist die Eizelle die der Zirkulation am besten zugängliche Zelle im Vogel. In späteren Stadien wird Eigelbmaterie in den Blutstrom des sich entwickelnden Embryos durch Zellen des Dottersackendoderms mobilisiert. Eine mit Eigelbkomponenten assoziierte DNA wird von den sich schnell teilenden Zellen des frühen Blastoderms aufgenommen und in das Genom von einigen dieser Zellen stabil inkorporiert. Da manche dieser Zellen Vorläufer von Keimzellen sind, können auf diese Weise chimäre Tiere mit Gonaden erzeugt werden, die eine Mischung von transgenen und normalen Zygoten enthalten. Wenn der Anteil der transgenen Gameten hoch genug ist, gelingt die Ausbrütung einer F1 Generationen von transgenen Tieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Erzeugung transgener Zellen, wobei

- (a) man einen Konjugat-Nucleinsäure-Komplex mit Zellen, an deren Oberfläche ein Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie lokalisiert ist, unter solchen Bedingungen in Kontakt bringt, daß eine Internalisierung der Nucleinsäure in die Zellen erfolgt, und
- (b) solche Zellen identifiziert, in denen die eingeführte Nucleinsäure exprimiert wird.

Vorzugsweise ist an der Oberfläche der Zellen der Hühnereizellen Rezeptor p95 lokalisiert. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können fremde Nucleinsäuren in eine in vitro kultivierte Zelle oder auch in eine Embryonalzelle eines Tiers, insbesondere in eine Embryonalzelle einer eierlegenden Spezies, z. B. in eine Hühnerembryonalzelle eingeschleust werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch eine transgene Zelle bzw. ein transgenes Tier, die durch ein Verfahren wie zuvor definiert erzeugt wurden. Auch Keimzellen dieses transgenen Tieres bzw. die aus diesen Keimzellen erhältlichen Nachkommen sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Das transgene Tier oder ein Nachkomme davon können als Bioreaktor zur Herstellung rekombinanter Polypeptide in Eiern verwendet werden. Außerdem kann das transgene Tier oder ein Nachkomme davon zur Erzeugung cholesterinärmer Eier verwendet werden. Hierzu wird in die Keimbahn eine Nucleinsäure eingeschleust, deren Expression eine Reduzierung des Cholesterinstoffwechsels oder/und eine Verringerung der Cholesterinaufnahme in das Ei bewirken kann.

Die Steuerung des Cholesteringehalts von Eiern kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß transgene Hühner erzeugt werden, die variante Formen von p95 enthalten, die eine geringere Affinität für VLDL aufweisen und gegebenenfalls andere Liganden präferent erkennen. Auf diese Weise kann die VLDL-Endozytose und somit der Cholesteringehalt des Eis reduziert werden. Geeignete Varianten von p95 weisen Mutationen insbesondere in einer oder mehreren der Ligandenbindedomänen (Lokalisierung vgl. WO 95/15379) auf. Alternativ oder zusätzlich können variante Formen von p95 erzeugt werden, die eine verringerte Fähigkeit zur Internalisierung von Liganden, insbesondere VLDL, aufweisen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von RO-Hühnern (Bujo et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9905—9909) zur Herstellung transgener Hühner, die Eier mit verringerten Cholesteringehalt erzeugen. RO-Hühner ("restricted ovulators"), sind Hühner, die keine Eier legen und einen Defekt im p95-Rezeptor aufweisen. Die Zucht dieser Hühner kann mittels heterozygoter Trägerhähne erfolgen. In derartige RO-Hühner kann eine variante Form des p95-Gens eingebracht werden, durch welche die Eiablage wieder in Gang kommt. Vorzugsweise wird hierbei eine solche variante Form von p95 — wie zuvor erläutert — verwendet, die eine geringere Cholesterinaufnahme als die native Form von p95 bewirkt. Die Einführung des varianten p95-Gens erfolgt vorzugsweise als Bolusinfektion einer Genfähre, die eine für einen varianten p95 kodierende DNA enthält. Zur Keimbahntransformation ist dabei nicht — wie in der bisher erläuterten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung — eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von Nucleinsäuren erforderlich. Eine eventuell geringere Transformationseffizienz kann durch die Selektion auf Eiablage wieder ausgeglichen werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Erzeugung transgener Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man in die Embryonalzelle einer eierlegenden Spezies, die einen Defekt

Oocytenrezeptorgen enthält, ein variantes Oocytenrezeptorgen einschleust, wobei das variante Oocytenrezeptorgen für einen Oocytenrezeptor kodiert, der (a) eine im Vergleich zum defekten Oocytenrezeptor höhere Aufnahme von Lipoproteinen in die Zelle gestattet, so daß die Fähigkeit zur Eiablage wieder hergestellt wird, und (b) eine im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor geringere Aufnahme von Lipoproteinen gestattet, so daß ein Ei mit verringertem Cholesteringehalt resultiert.

Vorzugsweise wird das variante Oocytenrezeptorgen in die Embryonalzelle eines RO-Huhns eingeschleust.

Schließlich betrifft die Erfindung auch durch das Verfahren erzeugte transgene Zellen und Tiere sowie die Keimzellen und Nachkommen der transgenen Tiere. Die transgenen Tiere bzw. deren Nachkommen können zur Erzeugung cholesterinärmer Eier verwendet werden.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch nachfolgende Beispiele näher erläutert werden.

### Beispiel 1

#### Gewinnung von Rezeptorliganden

Hühner VLDL, Vitellogenin und Riboflavin-bindendes Protein wurden aus mit Östrogenen behandelten Hähnen gewonnen (George, 1987, Supra; MacLachlan, 1994, Supra; Stifani, 1988, Supra) Lactoferrin wurde aus Kuhmilch, Apolipoprotein E aus Kaninchen- $\beta$ -VLDL und RAP aus rekombinanten Bakterienzellen gewonnen.

Eine Inspektion durch SDS-PAGE identifizierte Proteine von 16 kDa (Apoprotein-VLDL-II) und ca. 520 kDa (Apoprotein B) in VLDL; ein Triplet bei etwa 220 kDa (Vitellogenin); 27–29 kDa (Riboflavin-Bindungsprotein); ~80kDa (Lactoferrin); 36 kDa (Apoprotein E); und 39 kDa (RAP).

### Beispiel 2

#### Herstellung von Rezeptorligand-Nucleinsäure-Carrier Konjugaten

Die in Beispiel 1 isolierten Proteine und Lipoproteine wurden an Poly-L-Lysin unter Verwendung von 1-Ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid nach der von Wu et al (1989), J.Biol.Chem. 264, 16985–16987 beschriebenen Methode gekoppelt. Die Kopplungsbedingungen wurden variiert, um eine maximale DNA-Bindkapazität des resultierenden Protein/Poly-L-Lysin-Komplexes ohne signifikante Verringerung der Affinität an den Rezeptor zu erhalten.

Geeignete Kopplungsbedingungen waren die Verwendung von Poly-L-Lysin mit einem Polymerisierungsgrad von weniger als 20 und einem molaren Verhältnis von 10 : 1 bis 1 : 10 von Poly-L-Lysin zu Ligandenprotein je nach der zu komplexierenden DNA.

### Beispiel 3

#### Herstellung von Konjugat-Nucleinsäure-Komplexen

Die in Beispiel 2 hergestellten Konjugate wurden mit DNA komplexiert. Die Komplexbildung erfolgte bei einem molaren Verhältnis Phosphat- zu Aminogruppen von 1 : 2 bis 1 : 4 unter Einsatz von 6  $\mu$ g DNA oder Vielfachen davon in 250 mM Saccharose bei Raumtemperatur oder 4°C. Als DNA wurde Beta-Galactosidase Plasmid-DNA verwendet.

### Beispiel 4

#### Transfer von Konjugat-Nucleinsäure-Komplexen in in vitro kultivierte Zellen

Es wurde die Aufnahme der in Beispiel 3 hergestellten Konjugat-Nucleinsäure-Komplexe in mit p95 transformierte COS-Zellen (Bujo et al. (1994), Supra) untersucht. Diese Zellen exprimieren signifikante Mengen des Hühnereizellenrezeptors p95.

Die Zellen wurden in Gegenwart von Konjugat-Nucleinsäure-Komplexen für zwei Tage bei 37°C inkubiert, um eine Endozytose und Expression des Fremdgens zu ermöglichen. In Kontrollexperimenten wurden die Nucleinsäure oder das Konjugat allein zugegeben.

Die Analyse der Zellen erfolgte einerseits durch Verwendung  $^{32}$ P- oder  $^{125}$ I-markierter Protein/DNA-Komplexe und Messung der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität. Weiterhin wurde das Vorhandensein der Plasmide in den Zellen unter Verwendung der PCR-Technik nachgewiesen.

Die Stärke der Expression der DNA in den transfizierten Zellen wurde durch Anfärbung der Zellen mit X-Gal in Gegenwart von Ferricyanid und Ferrocyanid gemessen. Diese Anfärbung ist spezifisch für exprimierte Beta-Galactosidase, so daß positive Zellen auf einfache Weise durch ihre dunkelblauen Zellkerne identifiziert werden konnten (Bonnerot et al. (1987), Proc. Natl.Acad.Sci USA 84, 6795–6799).

Es wurden die in Tabelle 1 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 1

	Aufnahme (% der Zugabe) <sup>125</sup> I <sup>32</sup> P		Plasmidspiegel via PCR (rel. Scan-Units)	Enzymaktivität (arbit. Units)
<b>Komplex:</b> Kontrollzellen Transformanten	0.1-0.3 2.0-2.5	0.15-0.35 2.4-2.8	1 15-20	1 8-10
<b>Nukleinsäure alleine:</b> Kontrollzellen Transformanten	- -	0.4 0.4	- -	- -
<b>Konjugat allein:</b> Kontrollzellen Transformanten	0.2 0.25	- -	- -	- -

## Beispiel 5

## In vivo Gentransfer in Eizellen

Die in Beispiel 3 hergestellten Konjugat-Nukleinsäure-Komplexe wurden als einzelner Bolus von 100 µg Plasmid-DNA pro Henne in den Blutkreislauf von Legehennen injiziert. Zum Nachweis wurde <sup>32</sup>P markierte DNA verwendet. Weiterhin erfolgte der Nachweis der injizierten DNA durch PCR-Techniken.

Die der Injektion folgend gelegten Eier wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen gesammelt. Um den an unterschiedlichen Tagen abgelegten Dotter zu markieren, wurden dem Futter jeden Tag andere fettlösliche Farbstoffe zugesetzt. Die Eier wurden unmittelbar nach dem Legen hartgekocht und der Eidotter geschnitten, fotografiert und autoradiographisch analysiert. Nadelbiopsien des Dottermaterials aus Bereichen, die den farbstoffmarkierten Ringen entsprachen, wurden für eine quantitative PCR-Analyse verwendet.

Die Analyse der Eier ergab eine zeitabhängige Verteilung der DNA. Die am Tag nach der Injektion gelegten Eier zeigten die DNA in einem peripheren Ring, in den folgenden 7–8 Tagen wanderten die Ringe zentripetal, und ab dem 8. Tag zeigten die Eier eine Ansammlung von Radioaktivität und PCR-amplifizierbarem Material in einer zentralen Region von etwa 5 mm Durchmesser.

## Beispiel 6

## Herstellung transgener Hühner

Eier von Hennen, die gemäß dem in Beispiel 5 beschriebenen Protokoll behandelt worden waren, wurden gesammelt und für bis zu 72 Stunden inkubiert. Die Embryos wurden dann seziiert und zur Anfärbung fixiert. Um das Ausmaß der Transformation von primordialen Keimzellen zu bestimmen, wurde eine doppelte Anfärbung auf Gegenwart von Beta-Galactosidase im Zellkern und mit einem Glycogen-spezifischen histochemischen Marker zum Nachweis der großen Glycogen-positiven Zellen im Keimbogen durchgeführt. Abhängig vom Entwicklungsstadium wurden die Embryos entweder vollständig oder als Schnitte angefärbt. Die Anzahl der Beta-Galactosidase-positiven, Glycogen-positiven Zellen als Prozentsatz der Glycogen-positiven Zellen wurde als Maß für die Wirksamkeit der Keimbahntransformation angenommen.

Aus den Eiern der gemäß dem Protokoll von Beispiel 5 behandelten Legehennen wurden Küken ausgebrütet. Von den männlichen Küken wurden Blutproben entnommen und durch PCR auf das Vorhandensein des eingeführten Fremdgens getestet. Aus den positiven Exemplaren wurden im Alter von 24 Wochen Samenproben entnommen und der Prozentsatz der transgenen Samenzellen durch in situ Hybridisierung an Schmierabstrichen von Samenzellen nach der Methode von Lichter et al. (1990), Science 247, 64–69 bestimmt. Hähne mit dem größten Prozentanteil an transgenem Sperma wurden zur Zucht verwendet. Die resultierende Nachkommenschaft wurde auf das Vorhandensein des eingeführten Fremdgens getestet.

Die Keimbahntransformation in männlichen Küken war mit einer Rate von bis zu ca. 5/100 erfolgreich.

## Patentansprüche

## 1. Konjugat umfassend

- (a) einen Liganden für einen Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie und
- (b) einen Nukleinsäure-Carrier.

2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein Lipoprotein, Eigelb-Vorläuferprotein, ein heterologes Rezeptor-bindefähiges Protein oder ein Rezeptor-bindendes Fragment eines solchen Proteins ist.

3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend VLDL, Apolipoprotein B, Apolipoprotein E, Lipoproteinlipase, α<sub>2</sub>-Macroglobulin, Preg-

- nancy Zone Protein, Vitellogenin, Plasminaktivator-Plasminaktivatorinhibitor 1-Komplex, Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A, 39 kD Rezeptorassoziertes Protein (RAP), Riboflavin-bindendes Protein, Rous-Sarcomavirus-Hüllprotein, Lactoferrin, Vesikular Stomatitisvirus-Oberflächenepitop oder Rezeptor-bindende Fragmente der zuvor genannten Substanzen.
4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand VLDL, Vitellogenin, Riboflavin-bindendes Protein, Rezeptor-assoziertes Protein, Lactoferrin, Apolipoprotein E oder ein Rezeptor-bindendes Fragment der zuvor genannten Substanzen ist. 5
  5. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein mit dem Rezeptor bindefähiger Antikörper oder ein Antikörperfragment ist.
  6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein einzelkettiges Antikörperfragment ist. 10
  7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand an den Hühnereizellenrezeptor p95 bindefähig ist.
  8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäure-Carrier ein Nucleinsäure-komplexierendes Polykation ist. 15
  9. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein mehrfach positiv geladenes Polypeptid, insbesondere Poly-L-Lysin, ist.
  10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäure-Carrier ein leeres Viruspartikel umfaßt.
  11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäure-Carrier ein leeres Viruspartikel von Adeno-assoziertem Virus (AAV) umfaßt. 20
  12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—11, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand mit dem Nucleinsäure-Carrier durch chemische Kopplung verknüpft ist.
  13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—12, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand mit dem Nucleinsäure-Carrier eine genetische Fusion bildet. 25
  14. Komplex eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1—13 und einer Nucleinsäure.
  15. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Rezeptorligand-Nucleinsäure-Carrier Konjugat nach einem der Ansprüche 1—13 mit einer Nucleinsäure unter Bedingungen inkubiert, bei denen eine Komplexbildung zwischen der Nucleinsäure-Carrier-Komponente des Konjugats und der Nucleinsäure stattfindet. 30
  16. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1—13 oder eines Konjugat-Nucleinsäure-Komplexes nach Anspruch 14 als Genfähre zur Einschleusung von Nucleinsäuren in eine Zelle.
  17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Herstellung transgener Tiere.
  18. Verwendung nach Anspruch 17 zur Herstellung transgener Vögel.
  19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Herstellung transgener Hühner. 35
  20. Verfahren zur Erzeugung transgener Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß
    - (a) man einen Konjugat-Nucleinsäure-Komplex mit Zellen, an deren Oberfläche ein Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie lokalisiert ist, unter solchen Bedingungen in Kontakt bringt, daß eine Internalisierung der Nucleinsäure in die Zellen erfolgt, und
    - (b) solche Zellen identifiziert, in denen die eingeführte Nucleinsäure exprimiert wird. 40
  21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß an der Oberfläche der Zellen der Hühnereizellenrezeptor p95 lokalisiert ist.
  22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nucleinsäure in eine in vitro kultivierte Zelle einschleust.
  23. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nucleinsäure in eine Embryonalzelle einer eierlegenden Spezies einschleust. 45
  24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nucleinsäure in eine Hühnerembryonalzelle einschleust.
  25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß man ein variantes p95-Gen einschleust. 50
  26. Transgene Zelle, erzeugt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 20—25.
  27. Transgenes Tier, erzeugt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 20—25.
  28. Keimzelle eines transgenen Tiers nach Anspruch 27.
  29. Nachkomme eines transgenen Tiers nach Anspruch 27.
  30. Verwendung eines transgenen Tiers nach Anspruch 27 oder eines Nachkommens davon als Bioreaktor zur Herstellung rekombinanter Polypeptide in Eiern. 55
  31. Verwendung eines transgenen Tiers nach Anspruch 27 oder eines Nachkommens davon zur Erzeugung cholesterinärmer Eier.
  32. Verfahren zur Erzeugung transgener Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man in die Embryonalzelle einer eierlegenden Spezies, die ein defektes Oocytenrezeptorgen enthält, ein variantes Oocytenrezeptorgen einschleust, wobei das variante Oocytenrezeptorgen für einen Oocytenrezeptor kodiert, der (a) eine im Vergleich zum defekten Oocytenrezeptor höhere Aufnahme von Lipoproteinen in die Zelle gestattet, so daß die Fähigkeit zur Eiablage wieder hergestellt wird, und (b) eine im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor geringere Aufnahme von Lipoproteinen gestattet, so daß ein Ei mit verringertem Cholesteringehalt resultiert. 60
  33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß man das variante Oocytenrezeptorgen in die Embryonalzelle eines RO-Huhns einschleust. 65
  34. Transgene Zelle, erzeugt durch ein Verfahren nach Anspruch 32 oder 33.

35. Transgenes Tier, erzeugt durch ein Verfahren nach Anspruch 32 oder 33.

36. Keimzelle eines transgenen Tiers nach Anspruch 35.

37. Nachkomme eines transgenen Tiers nach Anspruch 35.

38. Verwendung eines transgenen Tiers nach Anspruch 35 oder eines Nachkommens davon zur Erzeugung cholesterinärmer Eier.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65